
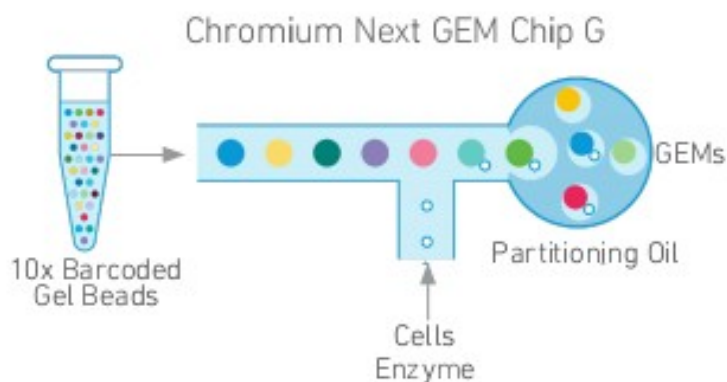



E-PREST-50	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banques Chromium Single Cell 3'RNAseq	Page 1/6

La technique de DGE sur la technologie 10X Genomics permet l'étude de l'expression de gènes dans 500 à 10000 cellules individuelles par échantillon. La technologie 10X GemCode permet grâce à un pool de 750 000 code-barres d'indexer le transcriptome d'un ensemble de cellules d'un échantillon. Cette indexage est réalisé en isolant des cellules dans des émulsions ou nano gouttelettes de billes de gel. Chaque cellule dans les nano gouttelettes va générer des ADNc qui vont partager le même code-barres 10X. Les banques ADN sont construites et séquencées à partir des ADNc et le code-barre 10X est utilisé pour assigner chaque séquences à une cellule.

Afin d'obtenir une résolution cellulaire, les cellules sont distribuées dans le système à une dilution limite. La majorité des nano gouttelettes ne contiennent pas de de cellules, les 1 à 10% des nano gouttelettes restantes contiendront une seule cellule.

Une fois dissoutes les billes de gel vont relarguées dans chaque nano gouttelettes des amorces contenant : la séquence du primers de séquençage du Read 1, un code-barres 10X de 16 nucléotides, un code-barres random de 12 nucléotides et un primer poly-dT. Toutes ces amorces vont être mélangées avec le lysat cellulaire et le mélange réactionnel pour la transcription inverse. L'incubation des nano gouttelettes de gel produisent des ADNc pleine longueur indexés et synthétisés à partir de l'ARN poly-dA. Après incubation les nano gouttelettes sont cassées et les ADNc sont purifiés.



E-PREST-50	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banques Chromium Single Cell 3'RNAseq	Page 2/6

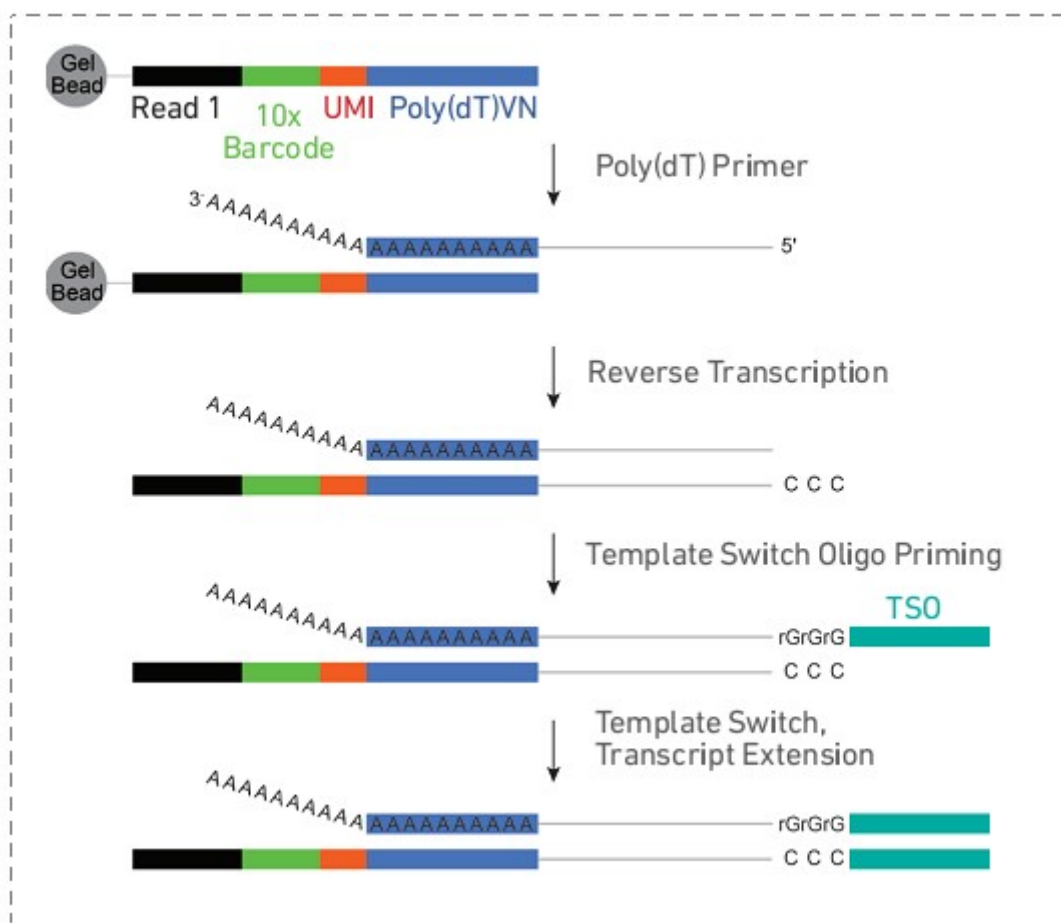
Prestation proposée


A partir des cellules individualisées fournis par le client, le plateau technique réalise les étapes de :

Étape :1 et 2

- Génération des nano gouttelettes ou émulsions
- Reverse transcription des ARN polyadénylés

Inside individual GEMs

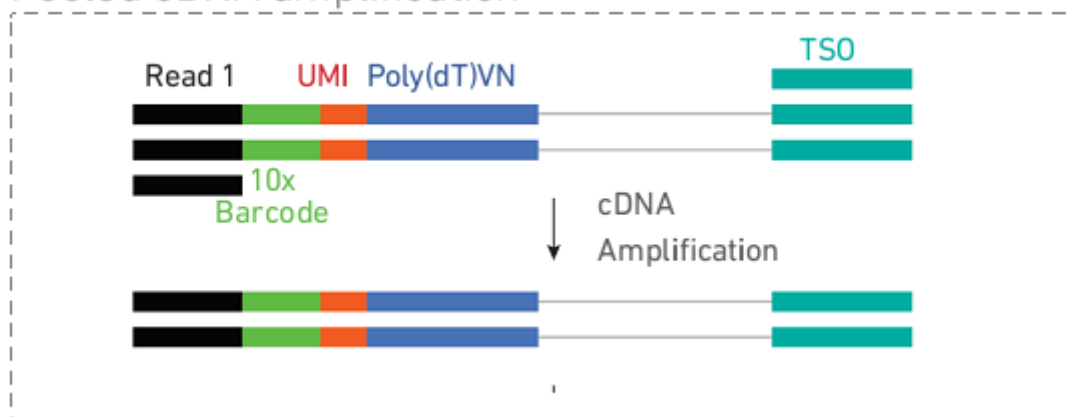


E-PREST-50	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banques Chromium Single Cell 3'RNAseq	Page 3/6

Étape 3 : Purification et amplification


- Lyse des nano gouttelettes et purification des ADNc
- Amplification des ADNc

Pooled cDNA amplification

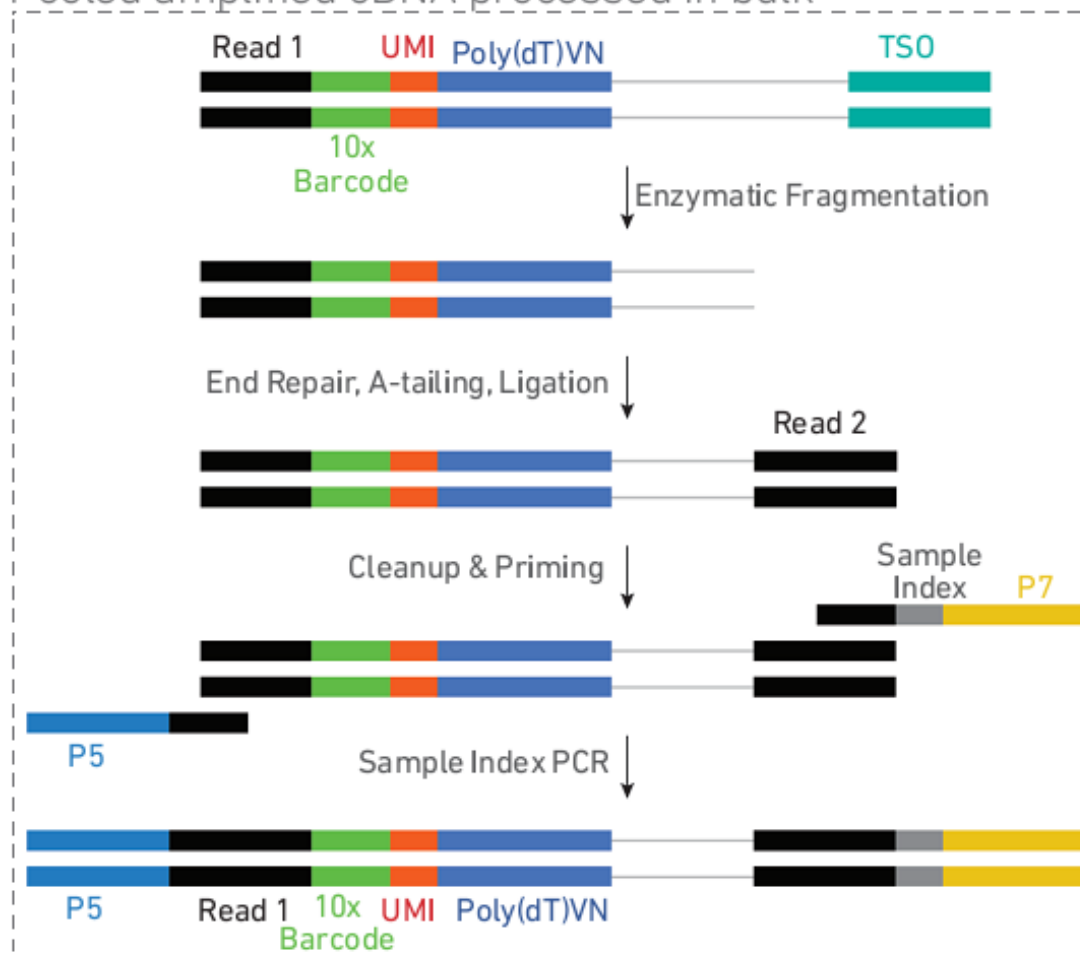


Étape 4. Construction des banques :

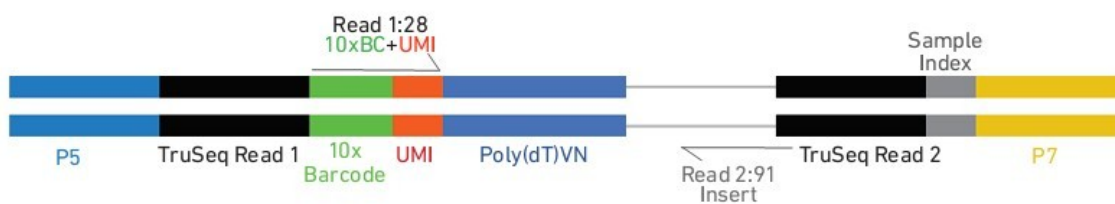
- Fragmentation des ADNc
- Réparation des extrémités
- Ajout d'un A en 3' de ces extrémités.
- Ligation d'adaptateurs indexés.
- Amplification par PCR.
- Vérification sur Fragment Analyzer et quantification par qPCR.


E-PREST-50	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banques Chromium Single Cell 3'RNAseq	Page 4/6

Pooled amplified cDNA processed in bulk



Structure de la banque d'ADN



E-PREST-50	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banques Chromium Single Cell 3'RNAseq	Page 5/6

Séquençage

Le mode de séquençage est spécifique à la construction des banques Single cell 10XGenomics.

Les banques sont séquençées en Pair End.

-Le Read1 permet la lecture des 16 nucléotides correspondant à l'index des cellules et 12 nucléotides de l'index codant pour une molécule de transcrit.

-L'index de l'échantillon est lu via l'index i7 et comporte 8 nucléotides.

-Le Read2 permet de lire la séquence de l'ADNc sur 86 nucléotides

Un pre-run de séquençage a faible profondeur est réalisé sur Miniseq (Mid output) pour vérifier la qualité des banques et estimer le nombre de cellules. Ceci afin d'équilibrer le mélange des banques en prenant en compte le nombre de reads par cellules.

Cf fiche E-PREST-30 Séquençage Illumina sur Miniseq.

Le séquençage est réalisé sur un Novaseq 6000 (Illumina) par la méthode de Sequence By Synthesis (SBS). Pour obtenir une bonne profondeur de lecture 10xgenomics recommande de produire entre 30k et 50K reads par cellules.


Cf fiche E-PREST-31 Séquençage Illumina sur Novaseq.

Matériel initial

La qualité du résultat final étant très fortement liée à la qualité des échantillons initiaux. Il est donc important d'éviter toute dégradation des cellules.

Type	Cellules
Quantités	900-17400
Concentration	700 cellules/ μ l à 1200 cellules/ μ l
Particularités	Cellules parfaitement dissociées sans débris, viabilité >90 %

Les tubes doivent être bien identifiés et correspondre aux informations notées sur la fiche échantillon dont une version vierge sera envoyée par le plateau technique.

E-PREST-50	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banques Chromium Single Cell 3'RNAseq	Page 6/6

Contrôle qualité

Tout au long de l'expérimentation, des tests sont réalisés par le personnel habilité pour valider ou non les différentes étapes. Ces tests sont les suivants :

Quantification de l'amplification des ADNc	
Quantité et qualité de l'ADNc	Profil électrophorèse, détermination de la quantité d'ADNc
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne **	450 pb ± 50 pb
Concentration	2 nM
Qualité de la banque vérifiée sur MiniSeq	
% de reads dans les cellules	≥ 60
Nombres de cellules estimées	500-10 000

** en incluant les adaptateurs.

Gestion du projet

Tout au long de l'expérimentation, vous pourrez suivre l'avancement du traitement de vos échantillons sur notre gestionnaire de projet (connexion sécurisée avec identifiant et mot de passe). Les différentes étapes du traitement seront validées par l'opérateur séquençage au fur et à mesure de l'avancement.

Dans la mesure où la plateforme constaterait que l'un des contrôles qualité donnés ci-dessus n'est pas rempli, le client sera contacté le plus rapidement possible pour déterminer avec lui la meilleure solution à apporter au problème.

Conditions et durée de conservation des échantillons et des données

Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C dans nos congélateurs, avec un système de congélateur de secours en cas de problème.

Une fois l'analyse réalisée et les données transférées au client, les reliquats d'échantillon et les banques produites seront éliminés.

De la même façon, nous nous engageons à conserver les données issues du séquençage uniquement jusqu'à la fin de l'analyse.